



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110926907 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201911033369.1

G01N 1/04(2006.01)

(22)申请日 2019.10.28

(71)申请人 内蒙古农业大学

地址 010018 内蒙古自治区呼和浩特市赛罕区昭乌达路306号

(72)发明人 格日乐其木格 神英超 陶力

王希生 白东义 赵一萍 张心壮
李蓓 芒来

(74)专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有限公司 11577

代理人 杜立军

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 1/36(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

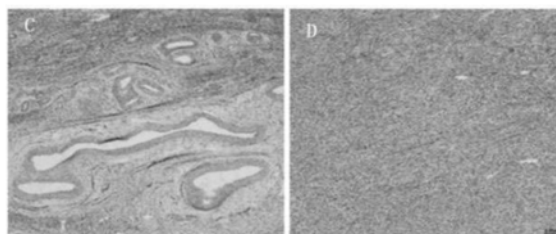
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法

(57)摘要

本发明实施例公开了一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,涉及生物学研究技术领域,所述方法包括如下步骤:取样固定、脱水、透明、浸蜡、抽气、包埋和切片制作。本发明实施例一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法增加了抽气过程,有效的去除了浸蜡过程中马属动物卵巢组织内部存在的气泡,并能极大程度上保持了卵泡的完整性,获得了良好的浸蜡和包埋效果,制作出的马属动物卵巢石蜡切片能有效的保护马属动物卵巢的组织结构的完整性,能获得较好的染色效果。



1. 一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:取样固定、脱水、透明、浸蜡、抽气、包埋和切片制作;所述取样固定采用的固定液为卡诺氏固定液。

2. 如权利要求1所述的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述取样固定的具体步骤为:取马属动物试验品经颈动脉放血致死后开膛取出卵巢,剪去卵巢系膜、卵巢髓质得卵巢组织,将所述卵巢组织采用固定液在-4℃条件下固定24h。

3. 如权利要求2所述的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述脱水的具体步骤为:将取样固定后的卵巢组织依次经过浓度为75%的酒精、浓度为85%的酒精、浓度为95%的酒精、浓度为100%的酒精逐级脱水,其中,浓度为75%的酒精脱水时间为24h以上,浓度为85%的酒精脱水时间为2h,浓度为95%和100%的酒精的脱水次数均为两次且每次脱水时间为1h。

4. 如权利要求2所述的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述透明的具体步骤为:将脱水后的卵巢组织放置于二甲苯透明剂中浸泡两次,每次浸泡时间为20-30min。

5. 如权利要求2所述的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述浸蜡的具体步骤为:将透明后的卵巢组织放置于软蜡中浸蜡三次,其中,第一次浸蜡的时间为1h,第二次和第三次浸蜡的时间均为40min。

6. 如权利要求1所述的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述抽气在所述浸蜡过程中进行;所述抽气的压力为0.01-0.05MPa。

7. 如权利要求1所述的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述包埋的具体步骤为:取用硬蜡铺底后的锡纸盒,在所述锡纸盒中先放入抽气后的卵巢组织,再倒入软蜡,然后于阴凉处静置12小时。

8. 如权利要求1所述的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,其特征在于,所述卡诺氏固定液由冰醋酸:氯仿:无水乙醇按1:3:6的体积比配置而成。

一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法

技术领域

[0001] 本发明实施例涉及生物学研究技术领域,具体涉及一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法。

背景技术

[0002] 石蜡切片是组织学观察中最为基础的一种制作切片的方法,作为传统的生物学研究技术,石蜡切片不但可以进行正常组织细胞形态学方法的观察,而且在病理学、免疫学、细胞原位核酸分子杂交、形态计量领域方面应用也非常广泛。石蜡切片需要经过固定、脱水、透明、透蜡、包埋、切片、贴片、脱蜡、染色、透明以及封片等步骤来使其组织细胞保持原有的结构并可以清楚观察和分析。

[0003] 由于马属动物的卵巢组织结构和性质与其他动物的器官组织有很大的差别,主要表现在其卵巢外部包裹一层白色的系膜髓质,而且在卵巢内部有较大的卵泡,卵泡内含有较多液体,排卵窝组织排列紧密,致使现存的适用于动物组织的石蜡切片制作方法和试剂不适用于马属动物的卵巢组织,不能制作出质量很好的卵巢切片。

发明内容

[0004] 为此,本发明实施例提供一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,以解决现有技术中由于马属动物的卵巢组织结构和性质的特殊性而导致的现存的适用于动物组织的石蜡切片制作方法不适用于马属动物的卵巢组织的问题。

[0005] 为了实现上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:

[0006] 根据本发明实施例的第一方面,一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法,所述方法包括如下步骤:取样固定、脱水、透明、浸蜡、抽气、包埋和切片制作;所述取样固定采用的固定液为卡诺氏固定液。

[0007] 进一步地,所述取样固定的具体步骤为:取马属动物试验品经颈动脉放血致死后开膛取出卵巢,剪去卵巢系膜、卵巢髓质得卵巢组织,将所述卵巢组织采用固定液在-4℃条件下固定24h。

[0008] 进一步地,所述脱水的具体步骤为:将取样固定后的卵巢组织依次经过浓度为75%的酒精、浓度为85%的酒精、浓度为95%的酒精、浓度为100%的酒精逐级脱水,其中,浓度为75%的酒精脱水时间为24h以上,浓度为85%的酒精脱水时间为2h,浓度为95%和100%的酒精的脱水次数均为两次且每次脱水时间为1h。

[0009] 进一步地,所述透明的具体步骤为:将脱水后的卵巢组织放置于二甲苯透明剂中浸泡两次,每次浸泡时间为20-30min。

[0010] 进一步地,所述浸蜡的具体步骤为:将透明后的卵巢组织放置于软蜡中浸蜡三次,其中,第一次浸蜡的时间为1h,第二次和第三次浸蜡的时间均为40min。

[0011] 进一步地,所述抽气在所述浸蜡过程中进行;所述抽气的压力为0.01-0.05MPa。

[0012] 进一步地,所述包埋的具体步骤为:取用硬蜡铺底后的锡纸盒,在所述锡纸盒中先

放入抽气后的卵巢组织,再倒入软蜡,然后于阴凉处静置12小时。

[0013] 进一步地,所述卡诺氏固定液由冰醋酸:氯仿:无水乙醇按1:3:6的体积比配置而成。

[0014] 本发明实施例具有如下优点:

[0015] 1、本发明实施例一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法增加了抽气过程,能促进二甲苯与软蜡的交换,有效的去除了浸蜡过程中马属动物卵巢组织内部存在的气泡,并能极大程度上保持了卵泡的完整性,获得了良好的包埋效果,有利于切片的制作。

[0016] 2、本发明实施例一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法使用卡诺氏固定液能穿透致密的卵泡壁细胞和颗粒细胞,到达卵泡内部,能使卵泡液变为胶装固体,因此能有效的固定了卵泡内的细胞和蛋白质,并且维持了卵巢的整体形态。卡诺氏固定液是由无水乙醇、冰醋酸、氯仿按比例配制而成,其重要特性是能迅速穿透细胞,将其固定并维持染色体结构的完整性,还要能够增强染色体的嗜碱性,达到优良染色效果。

[0017] 3、本发明实施例一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法缩短了脱水时间,为后续实验节省了时间成本。相较于传统的石蜡切片脱水时间,本发明缩短了每一步脱水的时间,并能达到良好的效果。

[0018] 4、本发明实施例一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法制作出的马属动物卵巢石蜡切片能有效的保护马属动物卵巢的组织结构的完整性,能获得较好的染色效果。用本方法制作出来的马卵巢石蜡切片进行了HE染色,获得了良好的效果,说明此方法能固定组织内的抗原物,可以进行后续的实验。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0020] 本说明书所绘示的结构、比例、大小等,均仅用以配合说明书所揭示的内容,以供熟悉此技术的人士了解与阅读,并非用以限定本发明可实施的限定条件,故不具技术上的实质意义,任何结构的修饰、比例关系的改变或大小的调整,在不影响本发明所能产生的功效及所能达成的目的下,均应仍落在本发明所揭示的技术内容能涵盖的范围内。

[0021] 图1为本发明实施例1提供的一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法中卵巢组织经取样固定后的卵泡结构示意图;

[0022] 图2为本发明实施例1、实施例2、对比例1提供的三种不同抽气处理后石蜡包埋效果对比图;

[0023] 图3为本发明实施例3提供的三组0.05Mpa压强抽气40分钟包埋图;

[0024] 图4为本发明实施例1提供的马卵巢石蜡切片的染色效果图;

[0025] 图5为实验例中采用表1的染色方法得到的卵巢整体切片染色图;

[0026] 图6为离图5中排卵窝较远的皮质观察图;

[0027] 图7为图5中排卵窝附近观察图。

具体实施方式

[0028] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 以下各实施例采用的原料及仪器如下:

[0030] 马属动物试验品:选自内蒙古自治区呼和浩特市孔家营屠宰场2-4岁的健康蒙古马;

医用冷藏箱:	中国青岛, 海尔电器有限公司
真空干燥箱:	中国上海, 立德泰克科学仪器有限公司
[0031] 通风橱:	中国山东, 金光玻璃钢集团公司
电热鼓风干燥箱:	中国上海, 一恒科学仪器有限公司
轮转式切片机:	中国上海, 徕卡显微系统有限公司
展片水浴锅:	中国上海, 莱卡仪器有限公司
双目光学显微镜:	德国, Carl Zeiss 公司
恒温水浴锅:	中国江苏省金坛市, 新瑞仪器厂
显微镜成像系统:	日本, OLYPUSCX 公司
计时器:	中国杭州, 精诚三和
无水乙醇	中国天津, 科茂化学试剂有限公司
[0032] 冰醋酸	中国广东, 西陇科学股份有限公司
氯仿	中国, 北京化工厂
Bouin 固定液	进口
二甲苯	中国天津, 永晟精细化工有限公司
苏木精	进口
伊红 (HE)	进口
中性树胶	中国, 国药集团化学试剂有限公司

[0033] 实施例1

[0034] 一种适用于制作马属动物卵巢石蜡切片的方法包括如下步骤:

[0035] (1) 取样固定

[0036] 取马属动物试验品经颈动脉放血致死后开膛取出卵巢, 剪去卵巢系膜、卵巢髓质得卵巢组织, 将所述卵巢组织采用固定液固定, 并装在冰袋盒内运回实验室再转移至在-4℃医用冷藏箱内放置24h; 所述固定液为卡诺氏固定液; 所述卡诺氏固定液由冰醋酸: 氯仿:

无水乙醇按1:3:6的体积比配置而成。

[0037] (2) 脱水

[0038] 将取样固定后的卵巢组织纵切成厚度为0.3-0.6厘米的组织片段,将切好的组织片段依次经过浓度为75%的酒精、浓度为85%的酒精、浓度为95%的酒精、浓度为100%的酒精逐级脱水,其中,浓度为75%的酒精脱水时间为48h,浓度为85%的酒精脱水时间为2h,浓度为95%和100%的酒精的脱水次数均为两次且每次脱水时间为1h。

[0039] (3) 透明

[0040] 将脱水后的卵巢组织片段放置于二甲苯透明剂中浸泡两次,每次浸泡时间为20-30min。

[0041] (4) 浸蜡、抽气

[0042] 将透明后的卵巢组织片段放置于软蜡中浸蜡三次,其中,第一次浸蜡的时间为1h,第二次和第三次浸蜡的时间均为40min。在第三次浸蜡的过程中同时进行抽气处理,抽气的压强为0.05MPa,抽气为五分钟。

[0043] (5) 包埋

[0044] 取用硬蜡铺底后的锡纸盒,在所述锡纸盒中先放入抽气后的卵巢组织片段,再倒入软蜡,然后于阴凉处静置12小时形成组织块。

[0045] (6) 切片制作

[0046] 将包埋后的组织块使用刀片进行修整后,用徕卡轮转式切片机切成8 μ m的蜡带,再用刀片截取组织完好的组织蜡片;将组织完好的组织蜡片放入水温40 $^{\circ}$ C的徕卡展片机内将其展开,再用载玻片粘取组织蜡片,直立放置室内使其自然风干得卵巢石蜡切片。

[0047] 实施例2

[0048] 本实施例的技术方案与实施例1相比,除了步骤(5)中的抽气压强为0.02MPa,其他技术方案同实施例1。

[0049] 实施例3

[0050] 本实施例的技术方案与实施例1相比,除了步骤(5)中的抽气时间为40min,其他技术方案同实施例1。

[0051] 对比例1

[0052] 本实施例的技术方案与实施例1相比,除了将浸蜡后的卵巢组织片段不抽气后包埋,其他技术方案同实施例1。

[0053] 对比例2

[0054] 本实施例的技术方案与实施例1相比,所述固定液为Bouin固定液,且卵巢组织经固定液固定后需进行水洗处理再进行脱水处理,其他技术方案同实施例1。

[0055] 对比例3

[0056] 本实施例的技术方案与实施例1相比,步骤(2)脱水与实施例1不同,其他技术方案同实施例1,具体的脱水方法如下:

[0057] 将取样固定后的卵巢组织纵切成厚度为0.3-0.6厘米的组织片段,将切好的组织片段依次经过浓度为50%的酒精、浓度为75%的酒精、浓度为85%的酒精、浓度为95%的酒精、浓度为100%的酒精逐级脱水,其中,浓度为50%的酒精脱水时间为24h,浓度为75%的酒精脱水时间为2h,浓度为85%、95%和100%的酒精的脱水时间均为1h。

[0058] 实验例

[0059] 1、两种固定液对比结果

[0060] 由对比例2的实验结果发现浸泡在Bouin固定液中的卵巢组织具有固定液的黄色,经过Bouin固定液的卵巢无论固定24、36、48、60小时或以上,卵巢卵泡液依然呈液体状,并且卵巢结构随卵泡液的流失而变形,卵泡壁颗粒细胞和卵细胞也会脱落并流失,无法制成卵巢石蜡切片,且Bouin固定液带颜色,需要先用水洗去浮色再进行下面步骤,对比卡诺氏固定液多一个水洗处理终止固定的过程。

[0061] 如图1所示,实施例1将卵巢组织采用卡诺氏固定液进行浸泡未发现组织变色,并且卵巢卵泡液呈黄色粘稠状液体,因而卵巢结构随卵泡液的破裂并未结构变形,说明卡诺氏固定液对马卵巢组织的穿透力更强,固定耗时对比比例2的Bouin固定液短。

[0062] 2、脱水透明结果

[0063] 采用对比例3的脱水方法制备马卵巢石蜡切片,发现卵巢组织在进行切片制作时组织块发软,导致切片机无法正常切割,其原因归根结底脱水不到位,导致后续的透明,浸蜡都收到了很大的影响。采用对比例3的脱水方法制备马卵巢石蜡切片,卵巢组织在进行切片制作时组织块软硬适中,适合于轮转式切片机切片。且经过多次验证,实施例1采用的酒精逐级脱水体系更有利于马卵巢石蜡切片的制作。

[0064] 3、浸蜡抽气处理结果

[0065] 由实施例1、实施例2、对比例1的实验结果并结合图2-3可以看出,图2中画圈区域代表气泡区域,如图2的左边图所示,对比例1将浸蜡后的卵巢组织片段不抽气后直接包埋,包埋后的组织块中产生了很多围绕着卵巢组织的气泡;如图2的中间图所示,实施例2将浸蜡后的卵巢组织片段在压强为0.02Mpa下抽气5分钟后组织周围依然有气泡产生,但对比例1明显少很多;如图2的右边图所示,实施例1将浸蜡后的卵巢组织片段在压强为0.05Mpa下抽气5分钟后,虽然组织周围还有少量气泡产生,但明显少于对比例1和实施例2,并且组织未发生收缩;如图3所示,实施例3将浸蜡后的卵巢组织片段在压强为0.05Mpa下抽气40分钟后,组织周围无任何气泡产生。

[0066] 另外,还做了抽气压强大于0.05MPa的实验,发现抽气压强大于0.05MPa抽气会使马卵巢组织和细胞结构严重变形收缩。通过多次试验,压强0.05MPa抽气适合于马属动物卵巢组织,抽气时间长短依据组织大小,薄厚,组织密度可以控制在40分钟或更长时间。

[0067] 4、采用实施例1的方法制备的马卵巢石蜡切片染色处理结果

[0068] 将采用实施例1的方法制备的马卵巢石蜡切片进行苏木素-伊红(HE)染色,通过显微镜观察其染色效果,其具体的染色方法如表1所示,染色效果如图4所示,细胞核被染成紫色,细胞质被染成红色,染色效果图的标尺为0.05mm,图4中左边C图为远离排卵窝的染色效果图、右边D图为排卵窝部位的染色效果图。

[0069] 表1 染色方法

	处理时间和次数 实验处理	染色方法
[0070]	60℃烤片	20分钟
	二甲苯	5分钟/两组
	100%酒精	5分钟
	95%酒精	4分钟
	80%酒精	3分钟
	70%酒精	2分钟
	蒸馏水	2分钟
	苏木精溶液染色	10分钟
	自来水冲洗	6分钟
	盐酸分化液	15秒
	返蓝液	10秒
[0071]	伊红染色	5秒
	自来水冲洗	5分钟
	95%酒精	1分钟30秒
	95%酒精	1分钟30秒
	100%酒精	1分钟30秒
	100%酒精	1分钟30秒
	二甲苯	1分钟30秒
	二甲苯	1分钟30秒
	中性树脂胶封片	

[0072] 由图4可以看出,采用实施例1的方法制备的马卵巢石蜡切片进行苏木素-伊红(HE)染色,细胞核与细胞质染色深浅适度,对比鲜明。

[0073] 在显微镜下观察马卵巢卵泡、卵细胞分布,图5为采用表1的染色方法得到的卵巢整体切片染色图,图5中,1为卵泡、2为皮质部、3为生殖上皮(排卵窝)、4为输卵管伞;图6为离图5中排卵窝较远的皮质观察图;图7为图5中排卵窝附近观察图,通过图5-7可以看出,该马卵巢卵泡分布不均匀,主要分布在离排卵窝较远的皮质当中,排卵窝附近无卵泡存在。

[0074] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。



图1

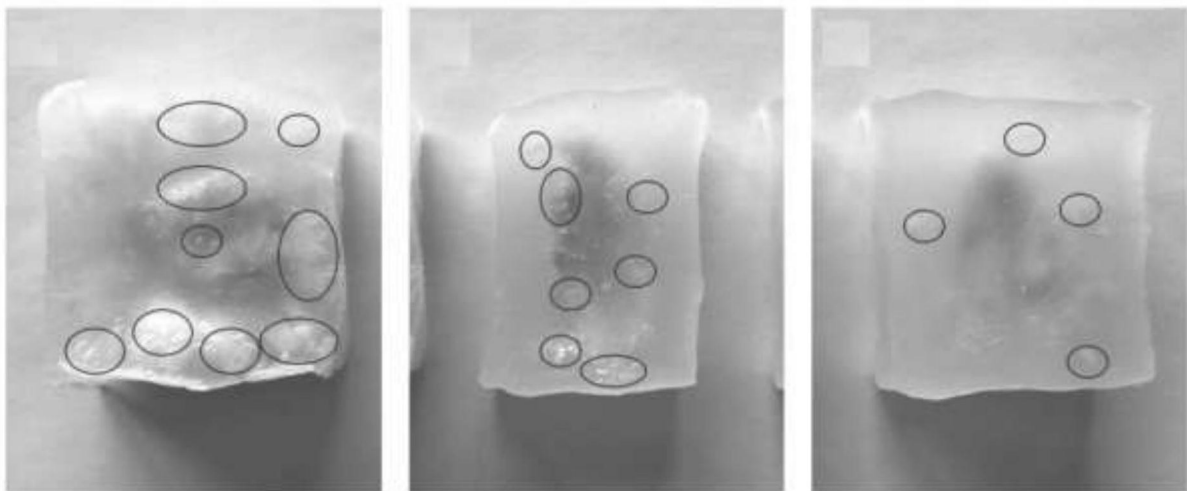


图2

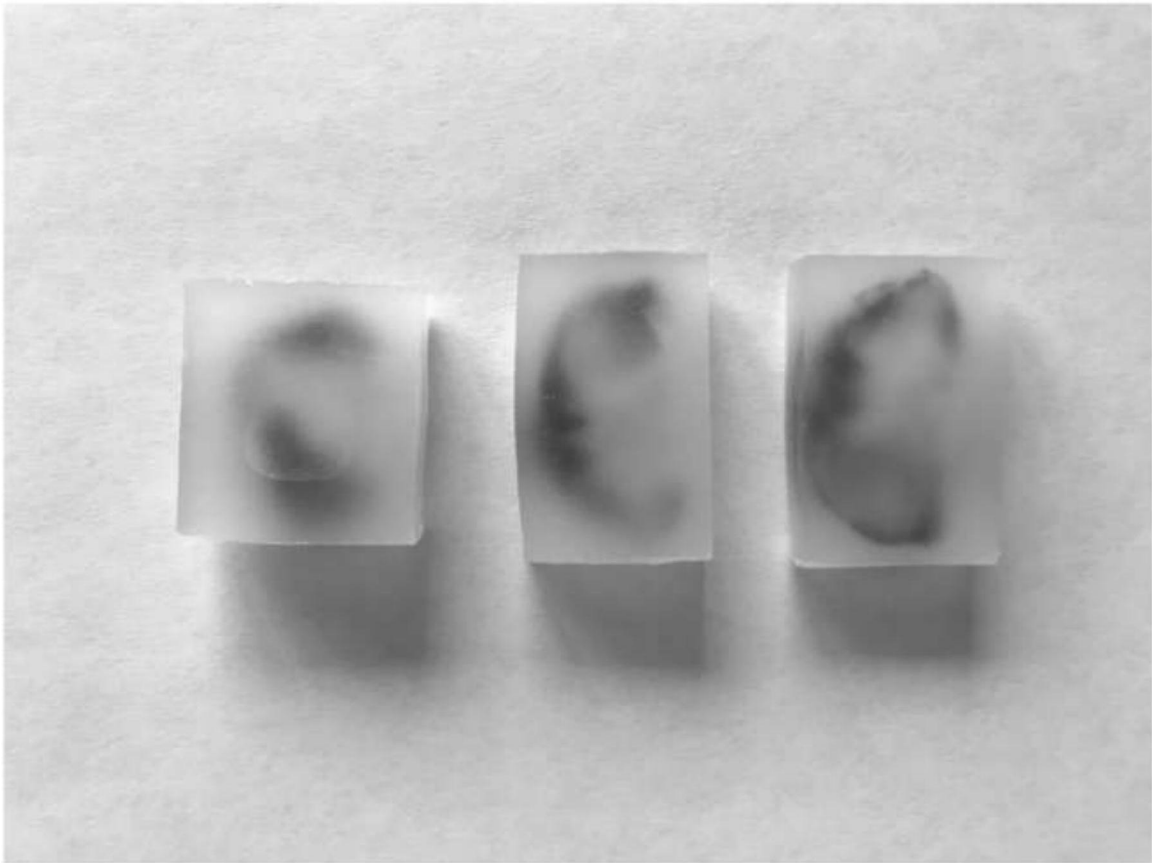


图3

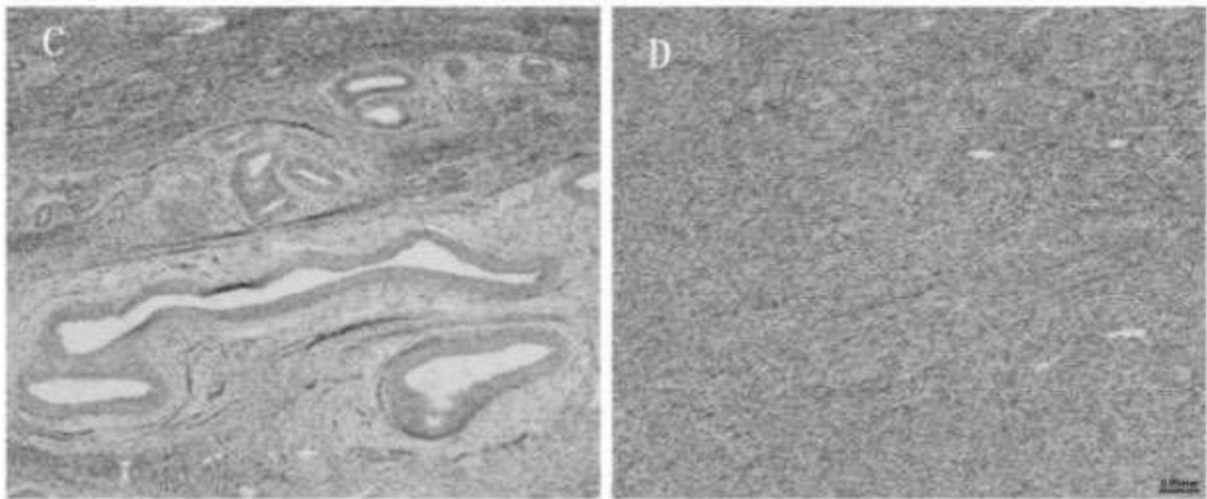


图4



图5

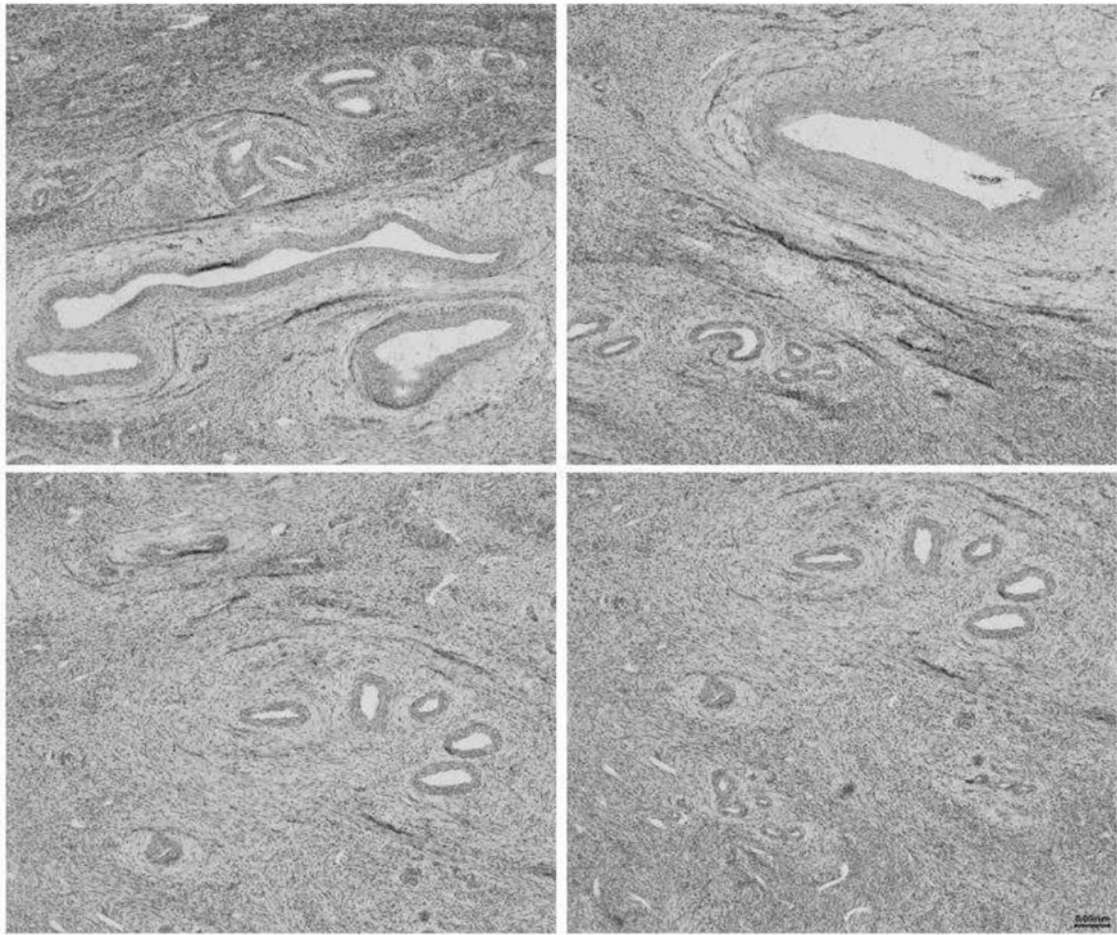


图6

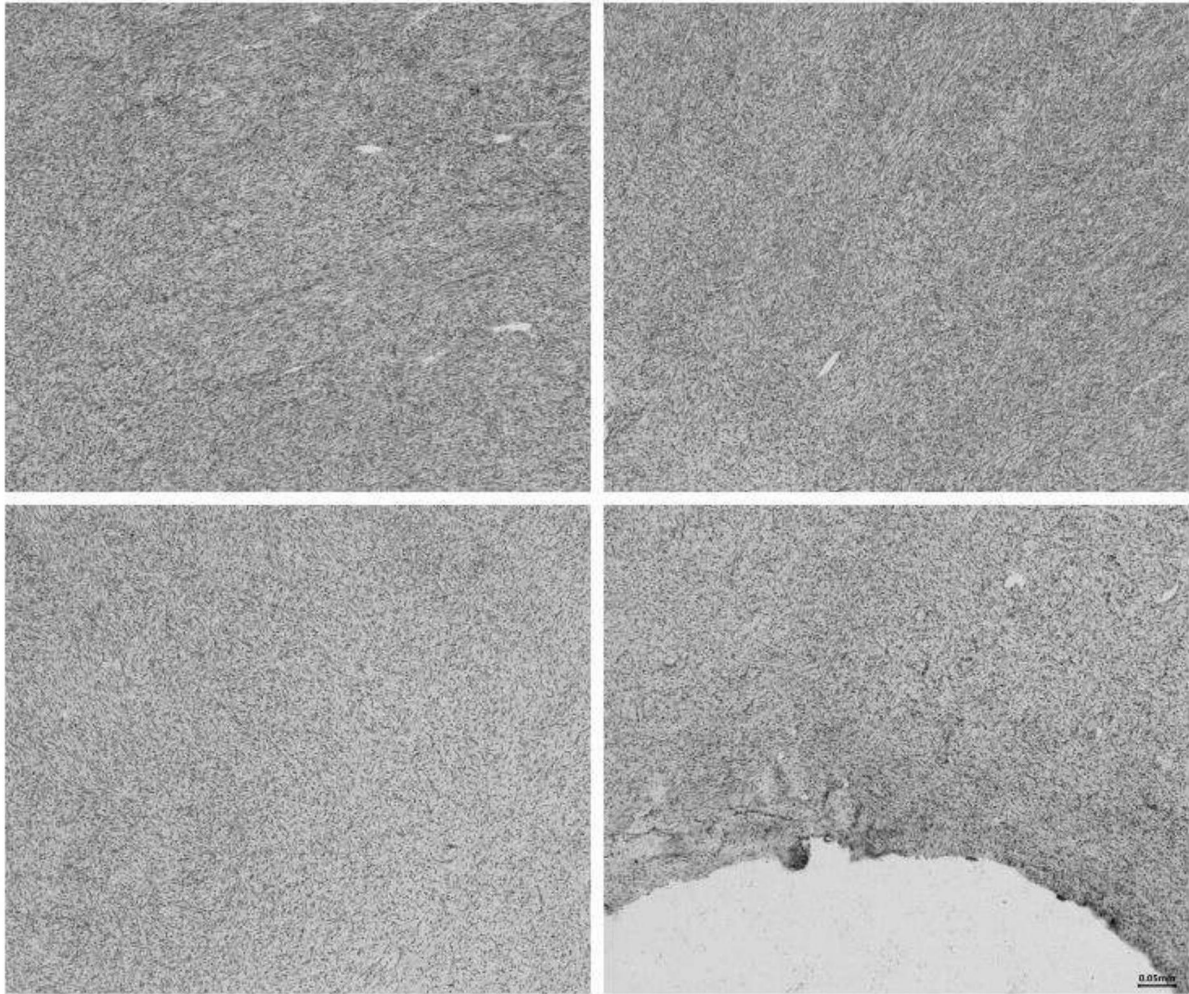


图7